

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 劉 啓徳

メタンは対流圏および成層圏で起こる光化学反応において重要な役割を果たしており、その濃度変動はオゾンや OH ラジカルなどの大気微量成分の動態に大きな影響を及ぼしている。また二酸化炭素(CO₂)、亜酸化窒素(N₂O)、クロロフルオロカーボン(CFC)などとともに温室効果ガスとしても知られており、メタン一分子当たりの温室効果が二酸化炭素の約 20 倍にも及ぶという事実に加え、大気メタン濃度が急激な割合で増加を続けていることが確認され、近年大きな注目を集めている。メタンの主要発生源は水田、自然湿地など嫌気的環境であり、好気的な土壌では大気からのメタン吸収が認められている。しかし IPCC(気象変動に関する政府間パネル)で各種メタン発生源からの年間メタン発生量の推定の根拠は科学的推定に基づくが、いまだ多くの不確定要因が存在すると指摘されている。メタン発生量をより正確に把握するためには各発生源でメタンの発生・吸収機構を解明することが重要である。本研究は土壌中のメタンの発生と分解に関与する微生物の動態を解明したもので5章より成る。

第一章の序論に続く第2章では水田(埼玉農林研究センター)、温帯林(丹沢大山)、熱帯林(インドネシアの Gununung walat と Haubentes の二カ所)、畑(インドネシア Institute Pertanian Bogor における実験圃場)などでガスをサンプリングし、各地のメタンフラックスを測定した。測定した土壌では、インドネシアの土壌(畑および森林)ではメタンは吸収され、日本の土壌(水田および森林)では発生するという結果を得た。次に、各々の土壌を採取し、培養実験により各土壌の潜在的メタン生成能と酸化能を明らかにした。その結果、水田土壌を用いた場合に、ほかの土壌サンプルよりも早くメタンが酸化されることが確認された。潜在的メタン生成能を測定する実験では、30 日間の培養期間で、水田土壌の平均メタン生成能が一番高いことが示された。さらに、この実験において、嫌気培養実験でメタンの濃度が激しく変化する現象が観察されたことから、海洋以外の場所でも嫌気性メタン酸化が起きていることが示唆された。

第三章では、第二章で観察された嫌気培養実験におけるメタン濃度の激しい変動について検討した。これまで嫌気性メタン酸化は深海のメタン湧水帯の堆積物や地下からメタンを含んだ湧水する場所などのところでしか発見されていない。また嫌気性メタン酸化が起こるところでは盛んに硫酸還元反応も行われている。このような場所のサンプルについて、16S rRNA 系統解析を行うと、メタンの嫌気性酸化は ANME-1 および ANME-2 と呼ばれる 2 つの古細菌グループ(*Methanosarcinales* 属に近縁)によって行われていることが報告されている。さらに ANME グループに対する特異的なプローブを用いて蛍光顕微鏡観察を行うと古細菌はしばしば硫酸還元細菌(SRB)とコンソーシアとして観察される。以上の事実から、ANME グループに属する古細菌と硫酸還元細菌は共生関係にあると考えられる。このことから、どちらの菌の生育にも適した条件を作ることで、嫌気性メタン酸化能を高めることができるか検証することを目的に、土壌試料に硫酸塩、酢酸、メタノールなどの基質を添加し、60 日間嫌気培養を行った。その結果、基質を添加しない場合にはメタン濃度の変化が少ないサンプルでも、嫌気培養開始 1 ヶ月後から著しい濃度変化が観察された。嫌気状態で *Methanosarcina* グループに属するメタン生成

菌が硫酸還元菌とともにメタンを酸化しているとするならば、メタン生成菌の生育を抑えた場合、嫌気性メタン酸化に影響する可能性がある。そこで、土壌試料にメタン生成反応の特異的阻害剤である BES(ブロモエタンスルホンサンナトリウム)を添加し、40 日間嫌気培養を行った。その結果、BES が存在しない条件で観察される激しいメタン濃度変化が見られなくなった。このことは、BES がメタン生成を押さえると同時にメタン酸化を抑制したと考えられた。この結果は、メタン生成菌がメタン生成をすると同時にメタンを酸化する反応を行う、即ち気相中のメタン濃度によって逆反応を行うという仮説(Hoehlerら,1994)を支持するものである。

第五章では、上記の嫌气的メタン酸化を観察する培養試験において、ANME グループのクローン解析および土壌中 DNA 量を定量する試験を定量的 PCR 法で行った。この結果、クローン解析では得られたクローンのなかに ANME2 に近い系統が見出されたため、海以外の環境で嫌気性メタン酸化古細菌が存在する可能性が示された。ANME グループの定量では、嫌気状態でメタン濃度の変動が大きい試料ほど嫌気性メタン酸化菌の数も多く検出された。

第六章では、第二章から五章で用いた土壌とは別のサンプル(埼玉水田土壌および東京湾海洋底質)を用いて、土壌中のメタン生成細菌を含めた古細菌の動態を解明するため、細菌菌体分離法による DNA 抽出によってクローン解析を行った。その結果、従来まで報告された全 DNA によるクローン解析と大きく異なる結果が得られた。この結果では、メタン生成細菌はごくわずかしか検出されず、大部分が培養困難な古細菌であった。この結果は、土壌中のメタン生成細菌とその他の古細菌では土壌中での生態が異なる可能性を示唆している。すなわち、メタン生成細菌は土壌構造内部に吸着した状態で生息していることを示唆している。

以上、本論文は土壌中の古細菌の挙動と嫌气的メタン酸化現象に新しい知見を加えたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。